

山形医学 2012 ; 30 (2) : 51-65

胃肝様腺癌の悪性度と転移能

佐藤英之, 上野義之, 河田純男*, 本山悌一**

山形大学医学部内科学第二講座

*兵庫県立西宮病院

**山形大学医学部人体病理学講座

要 旨

【目的】これまで明確な証拠に乏しかった胃肝様腺癌の悪性度について、その実態とそれに関わる因子を明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】臨床病理学的解析のために外科的に切除した胃肝様腺癌18例を材料とし、対照として低分化充実型腺癌31例、管状腺癌16例を用いた。実験的に浸潤・転移能を解析するために胃癌由来の肝様腺癌細胞株、低分化充実型腺癌細胞株、管状腺癌細胞株それぞれ1株を材料とし、細胞接着性試験、ゼラチンザイモグラフィ、ケモインベーションアッセイ、受精鶏卵漿尿膜法、ヌードマウスへの異種移植、リアルタイムPCRを用いた血管新生関連因子の発現量測定を行なった。また、外科的切除検体を用いて血管内皮の免疫組織化学を行ない、腫瘍新生血管の形態について評価した。

【結果】生存率を比較すると肝様腺癌は、低分化充実型腺癌、管状腺癌に比べて有意に予後不良であり ($P<0.05$)、静脈侵襲や肝転移が有意に多かった。培養細胞での検討では、肝様腺癌細胞株で細胞遊離能や基底膜の破壊能、浸潤能が特に高いとは言えなかった。受精鶏卵漿尿膜法で腫瘍細胞に誘導される新生血管の数に差はなかったが、ヌードマウス移植腫瘍で肝様腺癌細胞腫瘍においてのみ類洞様血管が見られた。血管新生関連因子の中で肝様腺癌細胞株において発現量が特に多かったものは、**Angiopoietin-1, -2**や**Angiogenin**であり ($P<0.05$)、一方特に低いものはなかった。外科的切除検体での組織学的検討では、肝様腺癌において低分化充実型腺癌、管状腺癌と比べて類洞様血管の形成が顕著であった。

【結論】胃肝様腺癌は、低分化充実型腺癌と比較して予後不良であることが判り、その原因は血行性転移のきたしやすさに求められた。さらに血行性転移のきたしやすさには、類洞様血管の形成が鍵となっていることが示された。

キーワード：肝様腺癌、胃、悪性度、転移、培養細胞

結 言

肝様腺癌 (hepatoid adenocarcinoma) は、Ishikura^{1), 2)}によって提唱された腺癌の特殊型で、腫瘍細胞は肝細胞様の好酸性の豊富な細胞質と円形ないし類円形の核を持ち、索状あるいは充実性の増殖を示し、 α -fetoprotein (AFP) などの蛋白を産生することを特徴とする。胃は肝様腺癌の最好発部位で、胃肝様腺癌は多くの人によって極めて悪性度の高い腫瘍との印象を持たれているが^{1) - 3)}、類似の増殖形態を示す通常型低分化充実型腺癌と比べても悪性度が高いのか否かということに関しては、これまで必ずしも十分な証拠はなかった。そこで、著者らはまず、外科的切除材料を用い、肝様腺癌と通常型低分化充実型腺癌との間で予後および予後因子に差がないかどうかを臨床病理学的に検討し、差があった場合には、それに関わる因子が何であるかを明らかにすべく、細胞培養系と移植系とを用いて調べることにした。

研究材料と方法

1. 外科的切除検体

1992年から2009年の間に山形大学医学部人体病理学教室および関連病院で胃の肝様腺癌であると確定診断された18例を用いた。対照として山形大学医学部人体病理学教室で診断した全低分化充実型腺癌例のうち経過の明らかな31例を用い、管状腺癌例は進行度がⅡAからⅢBの進行癌で、経過が把握できている16例を用いた。

なお、低分化充実型腺癌は内分泌細胞癌とリンパ球浸潤癌を完全に除きえたものとした。

2. 培養細胞

胃原発の肝様腺癌細胞株TSG11⁴⁾と対照として低分化充実型腺癌細胞株MKN45⁵⁾と管状腺癌細胞株MKN74⁵⁾とを用いた (表1)。実験期間中、いずれの細胞株も10%の割合の牛胎児血清 (PAA Lab., Pasching, Austria) を含むRPMI1640 (IBL, 群馬) 培養液で維持した。

3. 組織学的検討

臨床病理学的因子の検討のためには、病理診断のために用いた標本を再検討した。免疫組織化学的検討は、代表的ブロック2個を選び、間接酵素抗体法のUltraTech HRP Streptavidin-Biotin Detection System (Beckman Coulter, Marseille, France) を用いた。 α -fetoprotein (AFP) を検出するために抗AFPウサギポリクローナル抗体 (ニチレイ、東京) を、血管内皮を検出するために抗CD31マウスモノクローナル抗体JC70A (Dako, Grostrup, Denmark) をそれぞれ1次抗体として用いた。

4. 細胞接着性試験

培養細胞における細胞の接着性の強さを調べるために、Takeichi⁶⁾の方法を用いた。トリプシン処理をカルシウム存在下で行なうことによりカルシウム依存性接着分子を細胞表面に残したまま細胞を解離するTC処理、あるいはトリプシン処理をethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) 存在下で行なうことによりカルシウム依存性分子を細胞表面から除去し細胞を解離するTE処理の後、各細胞を 2×10^6 個/mlに調製し、1 mM塩化カルシウム存在下、非存在下

表1. 本研究で用いた胃癌培養細胞株

細胞株	由来患者 年齢・性	母腫瘍の組織型	培養細胞の由来
TSG11	46歳・女性	肝様腺癌	肝転移巣
MKN45	62歳・女性	低分化充実型腺癌	肝転移巣
MKN74	37歳・男性	中分化管状腺癌	肝転移巣

に分け、80rpmで巡回培養を行い、30分後に位相差顕微鏡で細胞の集合状態を観察した。

5. 基底膜分解能の測定

基底膜を構成する細胞外基質の分解能を調べるためにHeussenとDowdle⁷⁾のゼラチンザイモグラフィを用いた。1×10⁷個の癌細胞を無血清で48時間培養し、その培養上清を5倍に濃縮後、ゼラチンを含有させたポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、次いでゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼを活性化してゼラチンを分解させたところでクマシーブルーでゲルを染色した。IV型コラゲナーゼのMatrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9を検出した。

6. 間質への浸潤能の測定

基底膜への浸潤能を調べるためにケモインベージョンアッセイ⁸⁾を用いた。マトリゲルマトリックスでコートされた8μmの孔を持つフィルターを装着した24穴BioCoatTMマトリゲルTMインベージョンチャンバー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) の上室に0.1%牛血清アルブミン (BSA) (PAA Lab., Pasching, Austria) 含有RPMI1640培養液で調製した5×10⁴個/mlの細胞浮遊液を0.5ml入れ、下室に牛フィブロネクチン (ライフ研究所、山形) が最終濃度10μg/mlになるように調製した0.1% BSA含有RPMI1640培養液を0.75ml入れ、48時間培養し、フィルター下面に移動してきた細胞を数えた。

7. 血管新生の生物学的測定

腫瘍細胞により誘導される血管新生を調べるために、Knightonら⁹⁾の受精鶏卵漿尿膜法 (Chorioallantoic membrane assay: CAM法) を用いた。産卵後1日目のホワイトレグホンの受精鶏卵 (ゲン・コーポレーション、岐阜) を購入し、漿尿膜上に培養細胞をそれぞれ1×10⁶個移植した。腫瘍が約7mmとなったところで、実体顕微鏡で観察し、腫瘍周辺に見られる車軸状の血管を新生血管と評価した。

また、新生血管の性状を調べるために、1×10⁶個の培養細胞を6週齢ヌードマウス

(BALB/C-nu/nu) (日本クレア、東京) の背部皮下に移植し、腫瘍の最大径が約10mmになったところで腫瘍を摘出し、組織標本化した。

8. 血管新生関連因子の発現測定

表2に示す血管新生に関わる因子として知られている血管新生関連因子について、培養細胞での発現状態を調べるためにReverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いた。培養細胞よりTRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, California) を用いてRNAを抽出し、RT-PCRで発現が確認されたものについては、リアルタイムPCRで発現量を測定した。リアルタイムPCRは、Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California) を用い、7500/7500Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California) で行なった。Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロール遺伝子とし、相対定量法で評価した。

9. 統計学的処理

臨床病理学的因子の評価は、Fisherの直接確率計算法を用いた。血管新生関連因子のmRNA発現量については、3群の差の検定としてKruskal-Wallis検定を行なった。また、多重比較検定 (Bonferroni法) も行なった。生存率の比較にはKaplan-Meier法を用いた。いずれもP<0.05を有意差ありとした。

結 果

1. 臨床病理学的検討

肝細胞様の好酸性の豊富な細胞質と円形ないし類円形の核を持ち、索状あるいは充実性の増殖を示すということに加え、その胞巣内に免疫組織化学的にAFPが検出されるという要件 (図1) を備えた18例の胃肝様腺癌の臨床病理学的な所見は表3のごとくである。進行度IIAからIIIBまでを合わせたもので、生存率を通常型の低分化充実型腺癌群および管状腺癌群と比較し

表 2. 検討した血管新生関連因子

血管新生関連因子		PCR 用プライマー
VEGF-A	forward	CCCTCATCCTCTTCCTGCTC
	reverse	CAACCACTCACACACACAAC
PDGF-A	forward	ACCCACCTAAAGCAGCCAAC
	reverse	TCACGGAGGAGAACAAAGACC
PDGF-B	forward	AGGTGGGTTAGAGATGGAGTTTG
	reverse	GCAGGGTGGAGGTAGAGAGATG
Angiopoietin-1	forward	AGAGGTCAGAAGAAAGGAGCAAG
	reverse	CGAGGAAAGCAAAGGAAAGG
Angiopoietin-2	forward	TAACGGACCAAAGCAAGACC
	reverse	ATTCTCAGCCTCGGGTTCATC
Angiogenin	forward	ACACTTCCTGACCCAGCACT
	reverse	CCGTCTCCTCATGATGCTTT
Midkine	forward	CAAGAAAGGGAAGGGAAAGG
	reverse	AAGCTAACGAGCAGACAGAAGG
HGF	forward	TTCGAGCTATCGGGGTAAAG
	reverse	CCTCTGGATTGCTTGTGAAAC
bFGF	forward	TTTTCAGTCTTCGCCAGGTC
	reverse	TGAGTATTTCGGCAACAGCAC
GAPDH	forward	TTCGCTCTCTGCTCCTCCTG
	reverse	TTGACTCCGACCTTCACCTTC

VEGF: vascular endothelial growth factor, PDGF: platelet-derived growth factor

bFGF: basic fibroblast growth factor, HGF: hepatocyte growth factor

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase

てみると、肝様腺癌群の成績は有意に悪かった (図 2)。予後に関わる因子で、肝様腺癌と低分化充実型腺癌との間で有意の差が見られたのは静脈侵襲とリンパ節転移であった (表 3)。また、術前既に遠隔転移が確認されていた 4 例は肝転移で、これらを含め、死の転帰をとった 9 例に最終的には肝転移が確認されていた。肝様腺癌は、低分化充実型腺癌に比べると若年に発生していた。なお、低分化充実型腺癌群と管状腺癌群の生存率に有意差はなかった。

2. 細胞接着性

TSG11細胞は、MKN74細胞同様、TE処理後の細胞はカルシウムの存在の有無に関わらずほとんどバラバラであったが、TC処理後の細胞はカルシウム存在下では多数の集塊を作り、その程度はMKN74細胞よりも目立った (図3a, 3b)。また、MKN45細胞は、TC処理後もTE処理後もカルシウムの存在の有無に関わらずさらに多数の集塊を作った (図3c)。すなわち肝様腺癌TSG11細胞が特に遊離しやすいという所見はなかった。

胃肝様腺癌の悪性度と転移能

表 3. 臨床病理学的所見

	肝様腺癌 (n=18)	低分化充実型腺癌 (n=31)	P 値
年齢(平均年齢)	50-86(67.3)	53-90(76.2)	P<0.05
性別(男/女)	11/7	17/14	0.66
深達度			
pT1 (SM)	1	1	
pT2 (MP)	4	5	
pT3 (SS)	8	18	
pT4a(SE)	3	5	
pT4b(SI)	2	2	
進行度			
Stage I	1	3	
Stage II	8	19	
Stage III	5	9	
Stage IV	4	0	
腫瘍径 最小-最大 (mm)(平均)	32-175(76.6)	25-134(75.4)	0.90
リンパ節転移			
有	14(77.8%)	15(48.4%)	P<0.05
無	4(22.2%)	16(51.6%)	
術前遠隔転移			
有	4(22.2%)	0	P<0.05
無	14(77.8%)	31	
リンパ管侵襲			
有	13(72.2%)	14(45.2%)	0.07
無	5(27.8%)	17(54.8%)	
静脈侵襲			
有	15(83%)	8(25.8%)	P<0.05
無	3(17%)	23(74.2%)	

3. 基底膜分解能

MKN74細胞では主としてMMP-9 (92kDa)に相当する部位に、MKN45細胞ではMMP-2 (72kDa)に相当する部位に活性バンドを認めたが、TSG11細胞ではそのいずれにもほとんど活性バンドは認められず、また、他の部位にも活性バンドは検出されなかった(図4)。

4. 間質への浸潤能

ケモインベージョンアッセイでフィルター下

面に移動する細胞は、MKN45細胞で有意に多く(P<0.05)、MKN74細胞、TSG11細胞ではほとんど認められなかった(図5)。

5. 新生血管の数量と質

CAM法では、TSG11細胞、MKN45細胞、MKN74細胞の腫瘍周囲で血管密度に著差は生じなかった(図6b~6d)。

ヌードマウス移植腫瘍では、TSG11細胞が形成する腫瘍はしばしば拡張が著しい類洞様の血

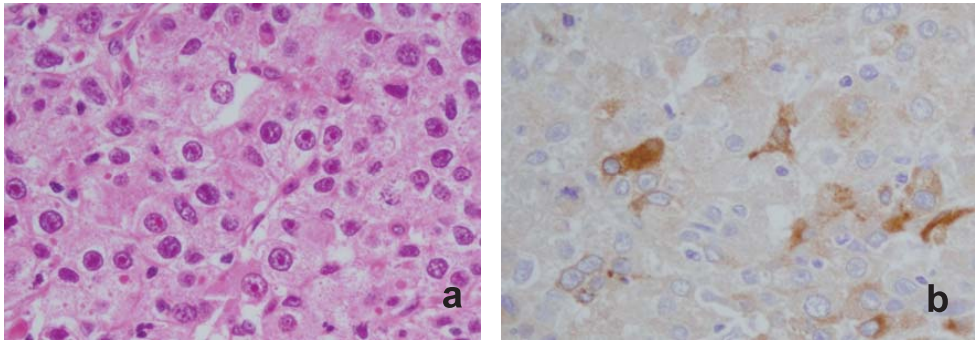


図1. 胃肝様腺癌の組織像：a. 好酸性の豊富な細胞質を持つ腫瘍細胞が充実性に増殖している。
b. AFPに対する免疫組織化学で陽性細胞が確認される。

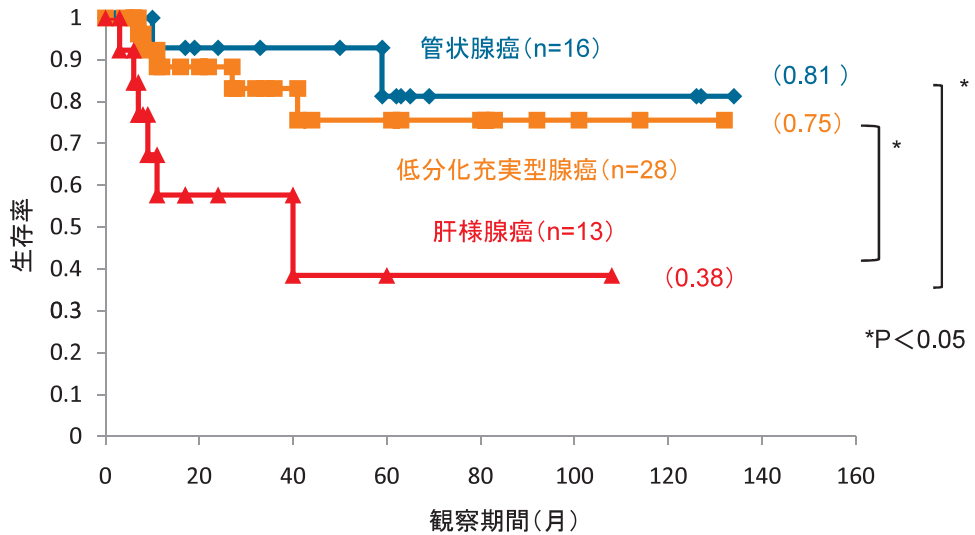


図2. 組織型別の生存曲線 (Stage II A~Stage III B)。肝様腺癌群は、管状腺癌群、低分化充実型腺癌群と比較して、有意に生存率が低い ($P<0.05$)。平均観察期間およびその中央値はそれぞれ、肝様腺癌群で24カ月、11カ月、低分化充実型腺癌群で43カ月、30カ月、管状腺癌群で54カ月、56カ月である。

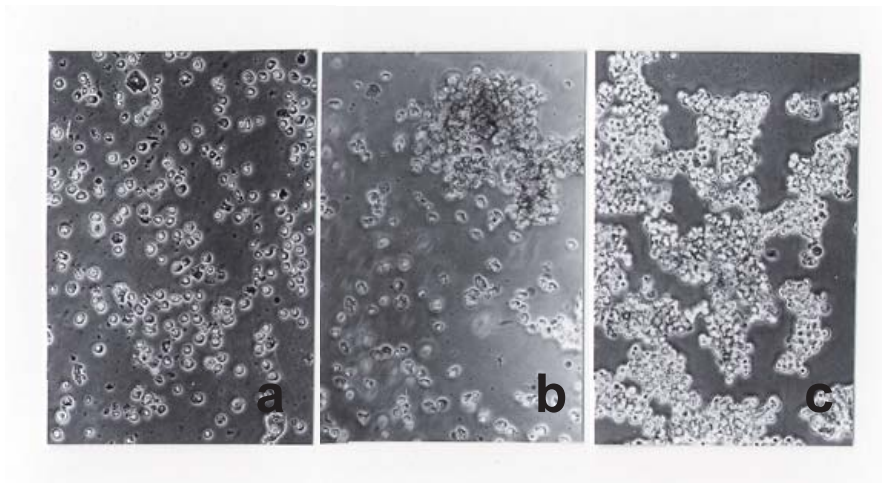


図3．細胞接着性試験：a. MKN74細胞、b. TSG11細胞、c. MKN45細胞。TSG11細胞は、TE処理後の細胞はカルシウム存在下でもバラバラであるが、TC処理後の細胞はカルシウム存在下で集塊を作る。その程度はMKN74細胞よりも目立つ。また、MKN45細胞は、TE処理後もTC処理後もカルシウムの存在の有無に関わらず、多数の集塊を作る。

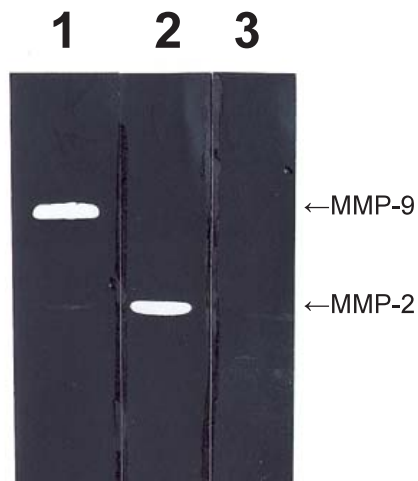


図4．ザイモグラムによるゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ活性：レーン1. MKN74細胞、レーン2. MKN45細胞、レーン3. TSG11細胞。MKN74細胞では主としてMMP-9の強い活性が認められ、MKN45細胞ではMMP-2の活性が認められる。TSG11細胞ではいずれにもほとんど活性は認められない。MMP: Matrix Metalloproteinase。

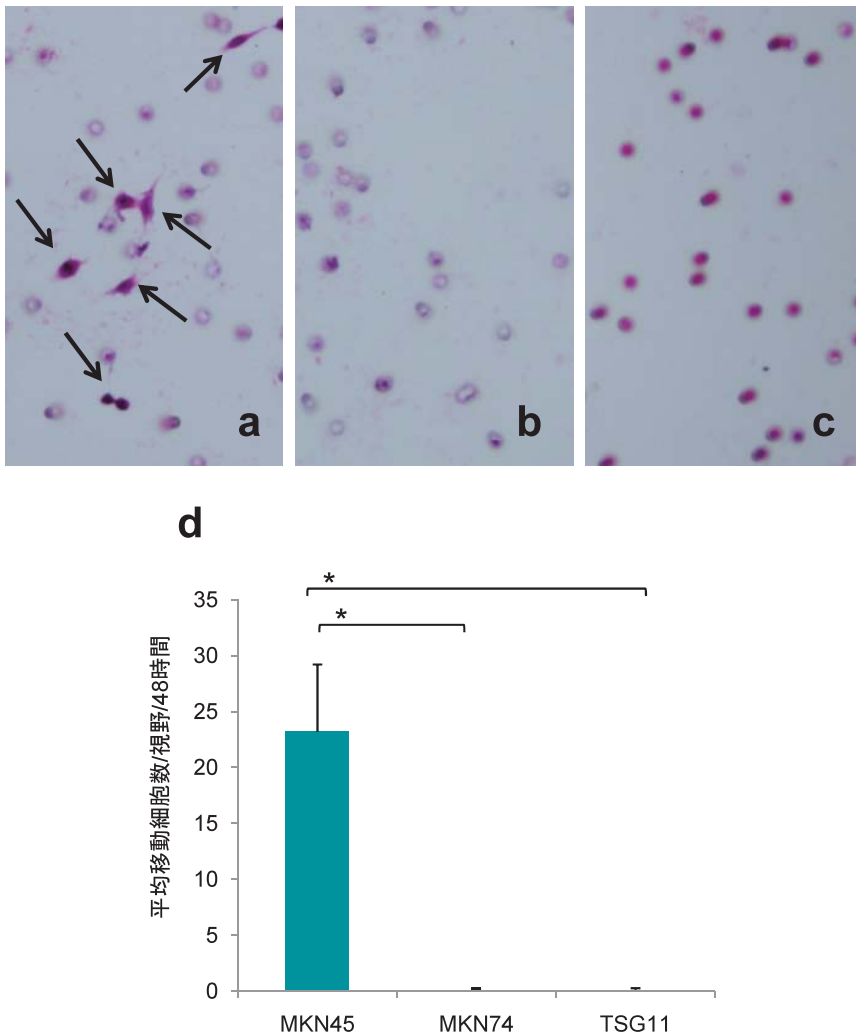


図5. ケモインベーションアッセイ: a. MKN45細胞、b. MKN74細胞、c. TSG11細胞。d. 200倍1視野あたりの平均移動細胞数。フィルター下面に移動した細胞は、MKN45細胞で有意に多く、MKN74細胞、TSG11細胞ではほとんど認められない (* $P < 0.05$)。矢印: 移動した細胞。

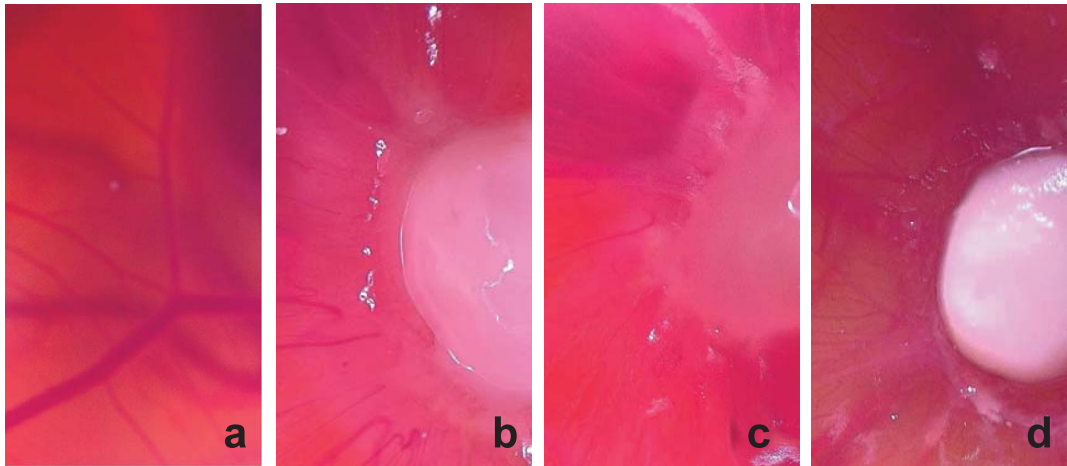


図6．受精鶏卵漿尿膜法：a. 移植前、b. TSG11細胞、c. MKN45細胞、d. MKN74細胞。腫瘤を中心に車軸状に集中する血管がTSG11細胞が多いということはない。

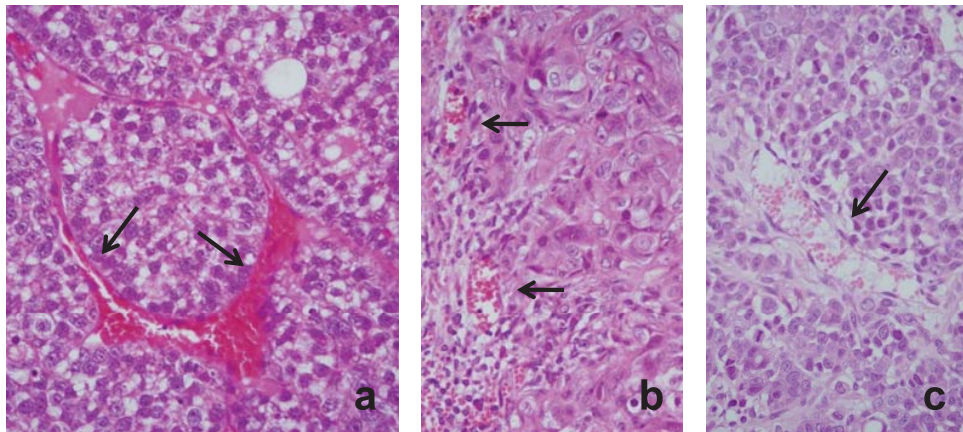


図7．ヌードマウス移植腫瘍の組織像：a. TSG11細胞、b. MKN74細胞、c. MKN45細胞。TSG11細胞が形成する腫瘍では類洞様の血管がみられるが、MKN74細胞が形成する腫瘍では、小径の円形ないし楕円形の血管のみである。MKN45細胞が形成する腫瘍では拡張した血管もみられるが、類洞様血管とまではいえない。矢印：血管。

管を含んでいたのに対し（図7a）、MKN74細胞が形成する腫瘍では小径の円形～楕円形の血管しか含まれていなかった（図7b）。MKN45細胞が形成する腫瘍は拡張した血管も含んでいたが（図7c）、類洞様と呼べる血管はなかった。

6. 血管新生関連因子の発現

血管新生関連因子mRNAの発現をRT-PCRで

みると、検索したVEGF-A, PDGF-A, PDGF-B, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiogenin, Midkine, HGF, bFGFのすべてにおいて、バンドがごく弱いものもあるが、3種の細胞株いずれでも発現が確認された（図8a）。リアルタイムPCRを用いた相対定量法での発現量は、VEGF-A, PDGF-A, PDGF-Bでは、3種の細胞

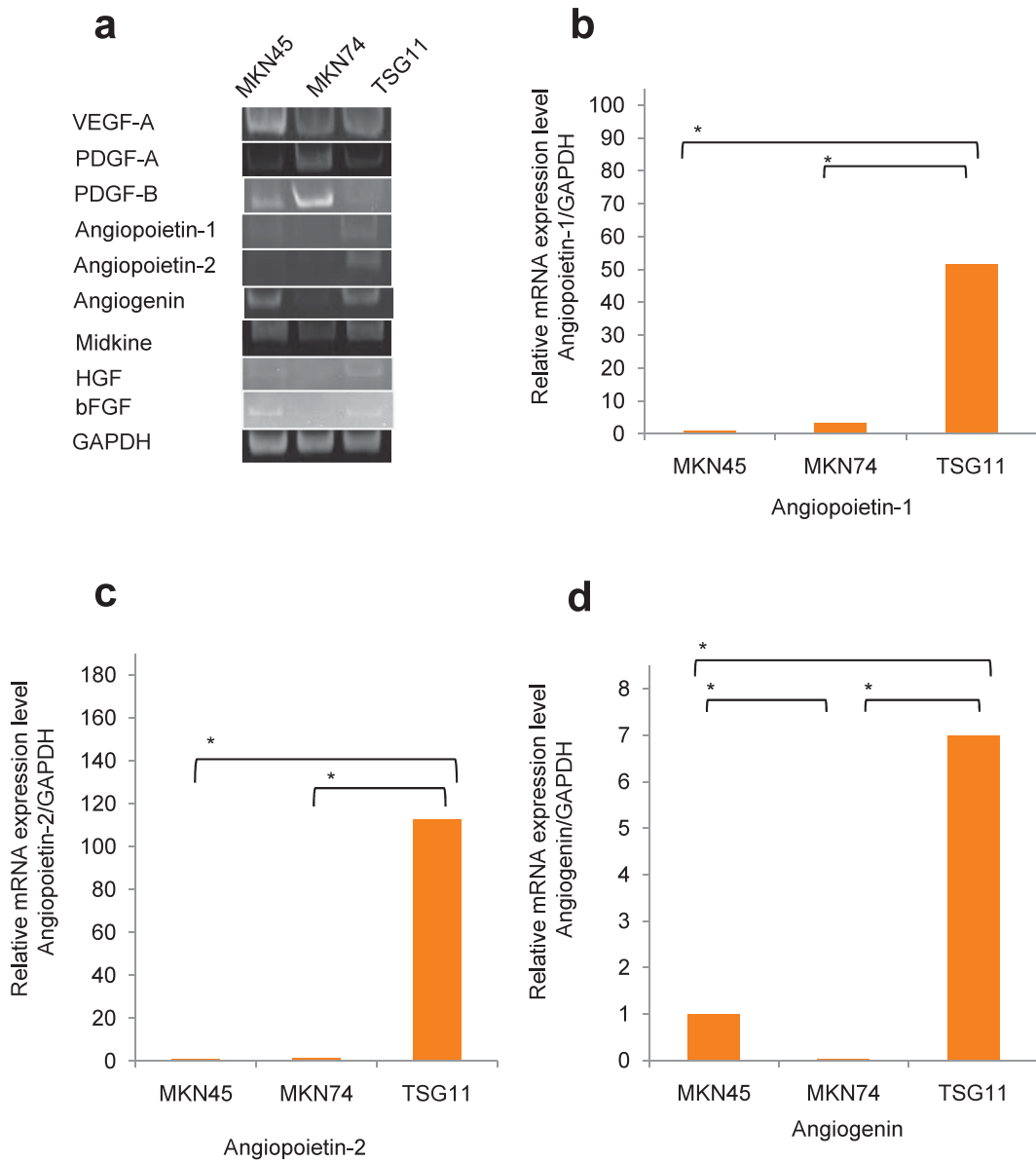


図8. 血管新生関連因子の発現測定: a. RT-PCRによる検出。b~d. リアルタイムPCR (相対定量法) によるAngiopoietin-1、Angiopoietin-2、AngiogeninのmRNA発現量の比較。b~d. Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、AngiogeninがTSG11細胞においてMKN45細胞、MKN74細胞より有意に発現量が多い (* $P < 0.05$)。

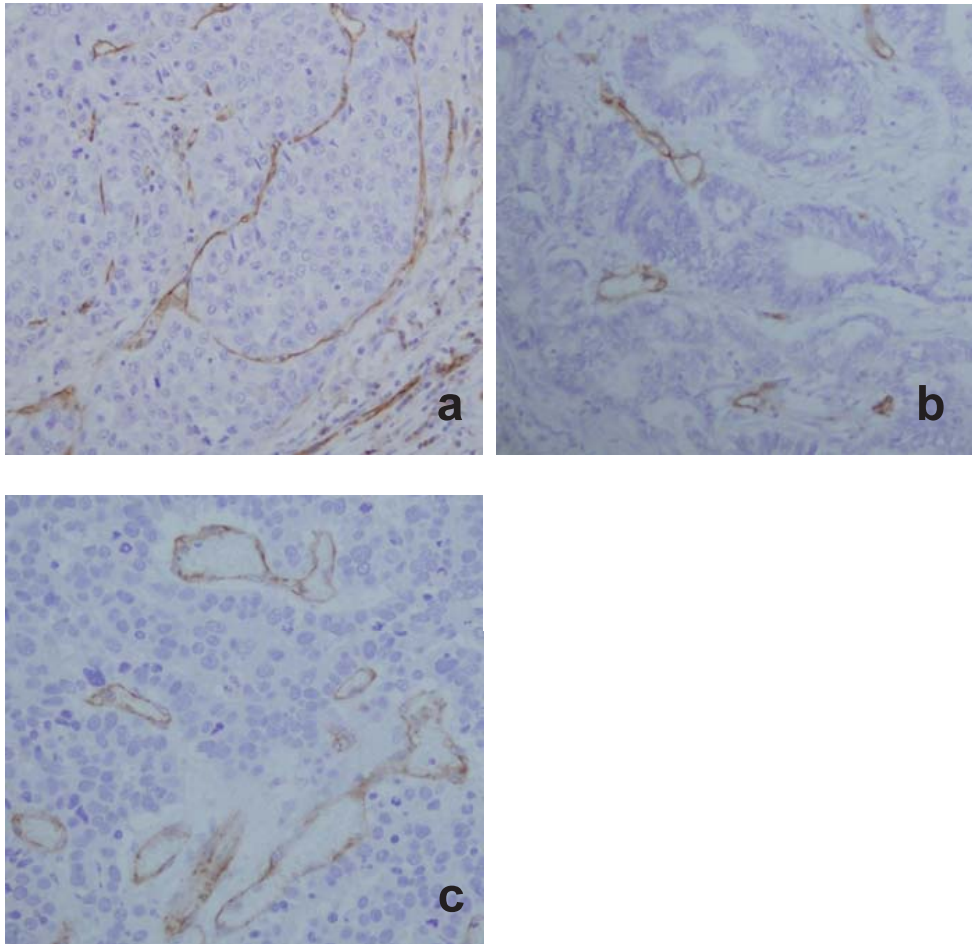


図9．外科的切除検体におけるCD31に対する免疫組織化学：a. 肝様腺癌。b. 管状腺癌。c. 低分化充実型腺癌。肝様腺癌では類洞様血管がみられる。管状腺癌、低分化充実型腺癌では類洞様血管の形成はなく、小径の血管が線維性結合織とともにある。

株で発現量に大きな差はみられなかった。Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiogenin, Midkine, HGF, bFGFについては、TSG11細胞でMKN45細胞、MKN74細胞より有意に発現量が多かった ($P<0.05$)。特に発現量の差が大きかったのは、Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiogeninでそれぞれ50倍、100倍、7倍程度であった (図8b～8d)。

7. 外科的切除検体における類洞様血管

CD31陽性細胞をマーカーとして、壁が薄く

内腔が著しく引き伸ばされ、腫瘍細胞塊と直接接している類洞様血管の有無を調べたところ、肝様腺癌では18例中全例に確認されたが (図9a)、低分化充実型腺癌では調べた20例では3例 (15%) にすぎず (図9c)、管状腺癌では調べた16例では全く認められず (図9b)、類洞様血管の出現頻度は肝様腺癌において有意に高かった ($P<0.05$)。

考 察

本研究で、胃肝様腺癌の生存率が低分化充実型腺癌や管状腺癌に比べて有意に劣ることが示されたことによって、これまで必ずしも明確な証拠のなかった胃肝様腺癌の予後の悪さ^{1) - 3)}は、初めて科学的に証明されたものと考えられる。特に低分化充実型腺癌との厳密な区別の上に両者を比較することが重要であるのは、肝様腺癌が低分化充実型腺癌と診断されていることが少なくなく、さらに低分化充実型腺癌の中には内分泌細胞癌が紛れ込んでいることも少なくないからである¹⁰⁾。本研究の結果では、低分化充実型腺癌と管状腺癌との間で予後に関して有意の差が認められてはならず、管状腺癌に比べて低分化充実型腺癌の予後が不良であるとする従来の報告¹¹⁾は再検討の必要性があることも示している。

胃肝様腺癌の悪性度の高さの重要な原因は、本研究でも有意に静脈侵襲が多く、かつ遠隔転移が多いことから、血行性転移にあると考えられる。血行性転移については、これまで多段階過程で説明されてきている¹²⁾。すなわち、原発巣からの遊離、基底膜の破壊、浸潤、間質内の移動、血管への侵入、血流による移動、標的臓器の血管壁への付着、血管外への侵出等の段階が考えられる。

実験材料として肝転移巣を初代培養の材料とした培養細胞株を用いたということは、それら全てが肝への転移能を持っていたとみなすことができる。多段階のどの段階で特に優れた機能を発揮するかを肝様腺癌細胞株TSG11、低分化充実型腺癌細胞株MKN45、管状腺癌細胞株MKN74でみたところ、原発巣から遊離して基底膜を破壊し間質に浸潤するまでの過程を模した実験、細胞接着性試験やゼラチンザイモグラフィ、ケモインベーションアッセイで、肝様腺癌細胞が他の2種の細胞に比べて特に活発であるということを示す結果は全く得られなかつ

た。

血行性転移において腫瘍と血管との関係を特に血管の側からみると、侵入されるべき血管の数が多いことと、侵入されやすい血管の性状とが想定される。CAM法で見る限り、誘導される新生血管の数に肝様腺癌細胞株、低分化充実型腺癌細胞株、管状腺癌細胞株で差はなかった。ヌードマウス移植腫瘍では、肝様腺癌株による腫瘍でのみ類洞様血管が認められたが、他の細胞株による腫瘍では認められなかった。

他方、培養細胞レベルでみた血管新生関連因子の発現は、代表的な血管内皮細胞の増殖・分化因子とされるVEGF-A¹³⁾や血管周皮細胞の増殖・分化に関わるとされるPDGF (-A, B)¹⁴⁾においては、3細胞株間に差はなかった。肝様腺癌細胞株において他の2細胞株との間に大きな発現量の差があったのは、Angiopoietin-1, -2、およびAngiogeninであった。肝様腺癌細胞株において発現が有意に低いというものは調べた限り認められなかったため、これらの高発現と類洞様血管形成との間に関連性があるかということが問題になる。

Angiopoietin-1は、血管内皮細胞と周皮細胞の接着を誘導することで血管の安定化に関わっているとされる¹⁵⁾。Angiopoietin-2は、Angiopoietin-1の生理的拮抗物質で血管内皮細胞と周皮細胞との接着を阻害し、内皮細胞の発芽を誘導することで血管は不安定な状態となり血管新生が促進されるとされる¹⁶⁾。Sugimachiら¹⁷⁾は、正常肝ではAngiopoietin-1がAngiopoietin-2より多く発現しているのに対し、肝細胞癌では逆となっていることから、肝細胞癌の血管新生にAngiopoietin-2が重要な役割を果たしている可能性を述べている。Angiogeninは、Angiogenin受容体が血管内皮細胞と周皮細胞とにあり、血管内皮細胞と周皮細胞の相互作用の調整をしているのではないかと考えられている^{18), 19)}。しかしながらこれらの因子と類洞様血管との関係は見えてこない。

そもそも類洞様血管と血行性転移との間に関

係があるのかということを考えるとき、Suginoらの一連の研究^{20)~23)}が参考になる。従来考えられていた血行性転移では、癌細胞の血管に侵入する前に必ず間質への浸潤の段階が必要であり、この転移様式は浸潤依存性転移¹²⁾ということができる。これに対して、Suginoらの提唱する浸潤非依存性転移では、癌細胞が直接類洞様血管に接し、おそらくは成長による容積増大という物理的圧力により、血管内に入り込み、確かにこの様式では癌細胞が原発巣と血管との間にある間質には一度も浸潤する必要はない。この説は、肝細胞癌や腎細胞癌、絨毛癌のように類洞様血管を伴いやすい腫瘍に血行性転移が多いとする古くからの半ば病理学的常識ともよく合う。

外科的切除検体に立ち返って、類洞様血管の形成が、肝様腺癌に有意に多いことから、類洞様血管の形成が肝様腺癌の血行性転移のきたしやすさに大きく関わっていると考えられる。

本研究の結果から、胃肝様腺癌は低分化充実型腺癌と比較して予後不良であることが判り、両者は厳格に区別する必要があると考える。また、肝様腺癌が予後不良である原因は血行性転移のきたしやすさに求められ、類洞様血管の形成が少なくともその一因と推測される。

文 献

1. Ishikura H, Fukasawa Y, Ogasawara K, Natori T, Tsukada Y, Aizawa M: An AFP-producing gastric carcinoma with features of hepatic differentiation. *Cancer* 1985; 56: 840-848
2. Ishikura H, Kirimoto K, Shamoto M, Miyamoto Y, Yamagata H, Ito T, et al.: Hepatoid adenocarcinomas of the stomach. An analysis of seven cases. *Cancer* 1986; 58: 119-126
3. Nagai E, Ueyama T, Yao T, Tsuneyoshi M: Hepatoid adenocarcinoma of the stomach. *Cancer* 1993; 72: 1827-1835
4. 原口雅臣, 高橋恒男, 本山悌一: 肝様腺癌培養細胞2株の樹立とその性状—特に浸潤・転移能と抗癌剤感受性の検討を加えて—。山形医学 2001; 19: 129-140
5. Motoyama T, Hojo H, Watanabe H: Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol Jpn* 1986; 36: 65-83
6. Takeichi M: Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 1977; 75: 464-474
7. Heussen C, Dowdle EB: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980; 102: 196-202
8. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al.: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3239-3245
9. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J: Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br. J. Cancer* 1977; 35: 347-356
10. 高野潤: 神経内分泌分化を示す胃充実型癌の臨床病理学的研究。山形医学 2010; 28: 59-69
11. Maruyama K, Kaminishi M, Hayashi K, Isobe Y, Honda I, Katai H, et al.: Gastric cancer treated in 1991 in Japan: data analysis of nationwide registry. *Gastric Cancer* 2006; 9: 51-66
12. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 563-572
13. Shibuya M, Claesson-Welsh L: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-556
14. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008; 22: 1276-1312
15. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S,

- Maisonpierre PC, Davis S, et al.: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-1180
16. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al.: Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60
17. Sugimachi K, Tanaka S, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Tsuneyoshi M: Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2003; 56: 854-860
18. Hu GF, Riordan JF, Vallee BL: A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2204-2209
19. Hatzi E, Badet J: Expression of receptors for human angiogenin in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* 1999; 260: 825-832
20. Sugino T, Kawaguchi T, Suzuki T: Sequential process of blood-borne lung metastasis of spontaneous mammary carcinoma in C3H mice. *Int. J. Cancer* 1993; 55: 141-147
21. Sugino T, Kusakabe T, Hoshi N, Yamaguchi T, Kawaguchi T, Goodison S, et al.: An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis. A new murine mammary tumor model. *Am J Pathol* 2002; 160: 1973-1980
22. Sugino T, Yamaguchi T, Ogura G, Saito A, Hashimoto T, Hosih N et al.: Morphological evidence for an invasion-independent metastasis pathway exists in multiple human cancers. *BMC Med* 2004; 2: 9
23. Sugino T, Yamaguchi T, Hoshi N, Kusakabe T, Ogura G, Goodison S, et al.: Sinusoidal tumor angiogenesis is a key component in hepatocellular carcinoma metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 835-841

A Study for Malignancy and Metastatic Potential of Hepatoid Adenocarcinoma of the Stomach

Hideyuki Sato, Yoshiyuki Ueno, Sumio Kawata*, Teiichi Motoyama**

Second Department of Internal Medicine, Yamagata University Faculty of Medicine

**Hyogo Prefectural Nishinomiya Hospital*

***Department of Human Pathology, Yamagata University Faculty of Medicine*

ABSTRACT

[Objective] To determine the malignant potential of hepatoid adenocarcinoma of the stomach (HAS) and the prognostic factors of patients with this cancer.

[Materials and methods] A clinicopathological analysis was performed on 18 surgically resected patients with HAS and controls (31 with poorly differentiated solid adenocarcinoma, 16 with tubular adenocarcinoma of the stomach). The invasive/metastatic potential and tumor angiogenesis were investigated using three gastric cancer cell lines. The morphology of tumor angiogenesis was also assessed in surgically resected specimens.

[Results] The HAS patients showed significantly shorter survival ($P < 0.05$) and higher venous invasion/hepatic metastasis rates than the poorly differentiated solid/tubular adenocarcinoma patients. The cell release, basement membrane destruction and invasive potentials were not significantly different among the three cell lines. Although the vessel number did not differ significantly, there were differences in the vessel morphology among the three cell lines. Histopathologically, sinusoidal vessel formation was more prominent in HAS than in poorly differentiated solid/tubular adenocarcinoma.

[Conclusion] HAS has poorer prognosis than poorly differentiated solid adenocarcinoma, which may account for the greater propensity of HAS for hematogenous metastasis. Furthermore, sinusoidal vessel formation may play a key role in the propensity for hematogenous metastases.

Key words : Hepatoid adenocarcinoma, Stomach, Malignancy, Metastasis, Cultured cell